

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Потупало Дмитрий Олегович

Выпускная квалификационная работа бакалавра

**Влияние метил-бета-циклодекстрина на миграцию
клеток**

Научный руководитель: зав. каф.
Биофизики, д.б.н., проф. Крутецкая З.И.

Научный консультант: зав. лаб. Ионных
механизмов клеточной сигнализации

Института Цитологии РАН,
д.б.н. Негуляев Ю.А.

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	7
1.1 Роль липидных рафтов в миграции клеток	7
1.2 Структура липидных рафтов	9
1.2.1 Основные компоненты и функции липидных рафтов.....	10
1.2.2 Модели липидных рафтов.....	11
1.2.3 Значимость липидных рафтов	13
1.2.4 Разрушение липидных рафтов с помощью	14
метил-бета-циклодекстрина (МБЦД).....	14
1.3 Что такое метил-бета-циклодекстрин?	16
1.3.1 МБЦД используется для удаления холестерина из клеточных мембран	17
1.3.2 Влияние МБЦД на распределение холестерина между различными клеточными мембранами	17
1.3.3 Извлечение холестерина из липидных рафтов	18
2. Материалы и методы	20
2.1 Клеточные культуры.....	20
2.2. Измерение подвижности клеток методом заращения экспериментальной раны	20
2.3. Определение скорости клеточного движения методом измерения миграции одиночных клеток	21
2.4. Микроскопия	21
2.5. Обработка изображений.....	22
2.6. Статистическая обработка данных.....	23
3. Результаты и обсуждение	24
3.1. Проверка автоматического метода работы программного обеспечения TScratch для измерения площади заращения экспериментальной раны.....	24
3.2 Измерение подвижности клеток методом заращения экспериментальной раны	25

3.3 Определение скорости клеточного движения методом измерения миграции одиночных клеток	28
4.Выводы	30
5.Список литературы	31

Список сокращений

МБЦД - метил-бета-циклодекстрин

FAK – киназы фокальных адгезий

GEF – фактор обмена гуанинового нуклеотида

ЕСМ – внеклеточный матрикс

РСК – раковые стволовые клетки

SFK – Src-семейство киназ

PIP – фосфатидилинозитол-4-монофосфат

PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

Введение

Миграция клеток на субстрате представляет собой сумму нескольких временных и пространственно-координированных процессов, которые включают в себя формирование псевдоподий на лидирующем активном крае, адгезию лидирующего края к субстрату, перемещение тела клетки и разборку адгезий (контактов) в хвостовой части клетки. Актиновый цитоскелет лежит в основе клеточного передвижения, его реорганизация обеспечивает движущую силу для продвижения вперед мембраны на лидирующем крае и тянущую силу для перемещения тела клетки (Wang et al., 2013). Формирование фокальных контактов на переднем крае клетки и их разборка на хвостовом участке также необходимы для перемещения клеток (Webb et al., 2002; Webb et al., 2004; Broussard, 2008). Факторы, влияющие на реорганизацию актинового цитоскелета, являются потенциальными регуляторами динамики фокальных контактов (Wang et al., 2013). Одними из таких вероятных факторов являются липидные рафты.

Липидные рафты являются особыми мембранными микродоменами, которые состоят из холестерина, сфинголипидов, включая сфингомиелин и ганглиозиды, а также некоторых типов белков. В структуру липидных рафтов входит Src-семейство киназ, регулирующих работу киназ фокальных адгезий (FAK). FAK влияют на миграцию клеток, регулируя активность малых ГТФаз Rho, белков, активирующих ГТФазу, фактор обмена гуанинового нуклеотида (GEF) (Schlaepfer et al, 2004; Mitra et al., 2005). Липидные рафты регулируют разборку фокальных контактов и играют важную роль при миграции опухолевых клеток, подчеркивая потенциал агентов, воздействующих на рафты, в качестве эффективных противораковых лекарственных средств. Одним из агентов, вызывающим разрушение липидных рафтов вследствие частичного извлечения мембранного холестерина, является метил-бета-циклодекстрин (МБЦД) (Wang et al., 2013).

МБЦД представляет собой циклический олигосахарид, состоящий из α -(1-4) - связанных звеньев D-глюкопиранозы, которые являются продуктами первичной деградации крахмала (Davis, Brewster, 2004; Uekama, 2004). Это соединение давно признано в качестве мощного носителя гидрофобных лекарственных средств, поскольку оно, хотя и растворимо в воде, содержит гидрофобную полость, которая может инкапсулировать различные гидрофобные молекулы. Относительно высокие (≥ 10 mM) концентрации МБЦД и относительно длительные (≥ 30 мин) воздействия приводят к истощению холестерина из всех мембранных фракций. Однако холестерин из липидных рафтов под действием циклодекстринов удаляется более эффективно, чем из других мембранных фракций (Gaus et al., 2004; Rouquette-Jazdanian et al., 2006).

Данные литературы свидетельствуют о том, что воздействие МБЦД на клетки меланомы человека (линия A375) вызывает увеличение числа фокальных контактов, стресс-фибрилл, и снижение скорости миграции (Wang et al., 2013). Обработка клеток эмбриональных фибробластов мыши (линия 3T3B-SV40) МБЦД также приводит к интенсивному формированию стресс-фибрилл (Чубинский-Надеждин, 2012). В то же время, роль МБЦД в подвижности клеток данной клеточной линии не изучена.

Целью данной работы было изучение влияния метил-бета-циклодекстрина на клеточную миграцию трансформированных эмбриональных фибробластов мыши (линия 3T3B-SV40).

Для выполнения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Проверить автоматический метод работы программного обеспечения TScratch для измерения площади застания экспериментальной раны.
2. Измерить подвижность клеток методом застания экспериментальной раны.
3. Определить скорость клеточного движения методом измерения миграции одиночных клеток.

1. Обзор литературы

1.1 Роль липидных рафтов в миграции клеток

Миграция клеток на субстрате представляет собой сумму нескольких временных и пространственно-координированных процессов, которые включают в себя формирование протрузии на лидирующем активном крае, адгезию лидирующего края к субстрату, разборку адгезий (контактов) в хвостовой части и перемещение тела клетки с подтягиванием хвостового участка к телу клетки. Эти процессы инициируются независимыми стимулами и регулируются различными механизмами. Однако они сложным образом взаимосвязаны, поскольку их регулирование включает себя множество общих сигнальных путей. Интегрины являются одними из наиболее важных молекул, влияющих на все три процесса. Эти белки, которые связываются с внеклеточным матриксом (ECM) и активируются им, приводят к сборке большого количества цитоплазматических сигнальных молекул (Giancotti, Ruoslahti, 1999; Hynes, 2002). На рисунке 1 демонстрируются этапы клеточного передвижения.

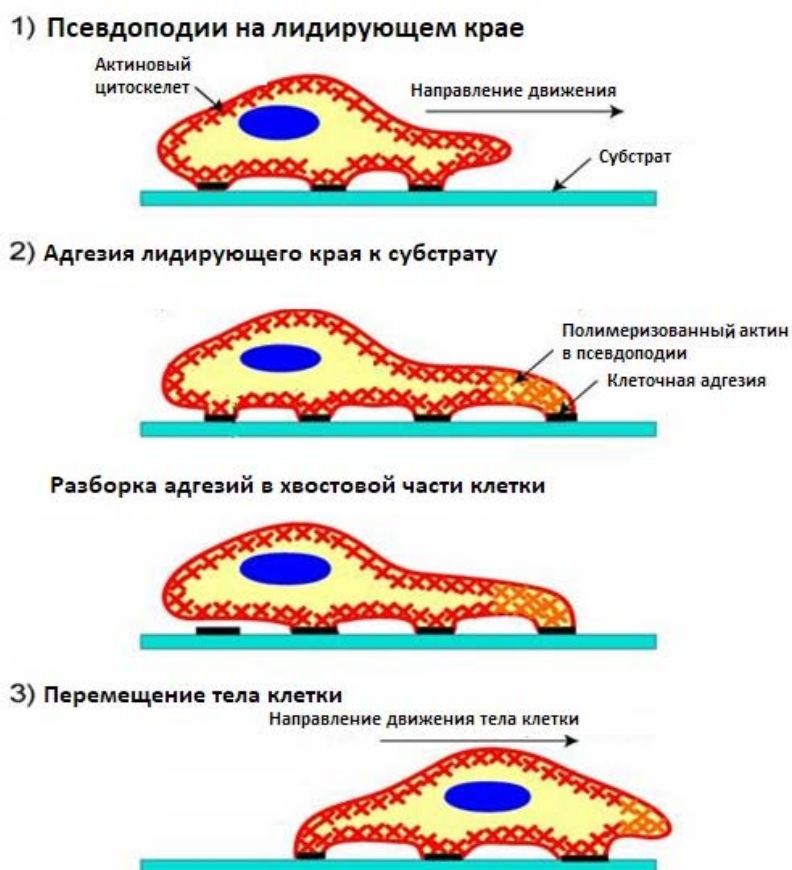


Рисунок 1. Этапы клеточного передвижения. Этапы включают в себя формирование протрузии на лидирующем активном крае (1), адгезию лидирующего края к субстрату (2), разборку адгезий в хвостовой части, перемещение тела клетки (3). Переработано по (Ananthakrishnan, Ehrlicher, 2007)

Организация актинового цитоскелета, опосредованная интегрином, является высокоэффективным процессом (Ramprasad et al., 2007). Образование актинового цитоскелета также контролируется в цитоплазме малыми ГТФазами, такими как RhoA, Rac1 и Cdc42, которые формируют стресс-фибриллы, ламеллиподии и филоподии, соответственно (Manneville, Hall, 2002). Реорганизация актинового цитоскелета играет ключевую роль в регуляции формы, адгезии и подвижности клеток (Ramprasad et al., 2007).

Реорганизация актинового цитоскелета обеспечивает движущую силу для продвижения вперед мембраны на лидирующем крае и тянущую силу для перемещения тела клетки (Wang et al., 2013). Формирование фокальных контактов на переднем крае клетки и их разборка на хвостовом участке необходимы для перемещения клеток, их продвижения вперед (Webb et al., 2002; Webb et al., 2004; Broussard, 2008). Более того, актиновый цитоскелет имеет тесную связь с динамикой фокальных контактов. С одной стороны, актиновый цитоскелет образует внутриклеточный каркас для фокальных контактов и обеспечивает натяжение клетки для роста адгезий (Kaverina et al., 2002; Wehrle-Haller, 2012). С другой стороны, дендритная деполимеризация актина приводит к разборке фокальных контактов в ламеллиподиях. Таким образом, факторы, влияющие на реорганизацию актинового цитоскелета, являются потенциальными регуляторами динамики фокальных контактов (Wang et al., 2013).

Одними из таких вероятных факторов являются мембранные микродомены, называемые липидными рафтами, которые образуют компартментные платформы для клеточного сигналинга и белок-белкового или белок-липидного взаимодействия. Липидные рафты участвуют в динамических процессах интернализации и рециклирования мембранного интегрина, который является структурным и функциональным ядром фокальных адгезий и связующим звеном между фокальными адгезиями и актиновым цитоскелетом во время клеточной миграции (Wang et al., 2013).

Таким образом, липидные рафты играют значимую роль в процессах миграции клеток. А нарушение целостности рафтов приводит к изменению клеточной подвижности.

1.2 Структура липидных рафтов

Преобладающая модель структуры клеточной мембраны, предложенная Зингером и Николсоном, называется жидкостно-мозаичной моделью, в которой глобулярные белки плавают в липидном бислое (Singer, Nicolson, 1972). Позже модель была усовершенствована Симонсоном и Ван Меером, которые включили в эту модель микродомены, или "рафты" (Simons, Van Meer, 1988). В современном понимании модель липидных рафтов, обогащенных холестерином и сфинголипидами, это микродомены плазматической мембраны, которые обладают жидко-упорядоченным состоянием (Toshiyuki, 2012).

Липидные рафты состоят из холестерина, сфинголипидов, включая сфингомиелин и ганглиозиды, а также некоторых типов белков. В составе сфинголипидов есть насыщенные жирные кислоты, которые обеспечивают плотное встраивание холестерина между молекулами сфинголипида с образованием жидко-упорядоченных микродоменов. Самым важным свойством липидных рафтов является то, что они небольшие по размеру, динамичные, неоднородные и могут включать или исключать из своего состава белки (Toshiyuki, 2012). Белки, включенные в рафты, представлены гликозфосфатидилинозитольным якорем (ГФИ-якорь), пальмитированными белками, дважды ацилированными белками, такими как Src-семейство киназ, трансмембранными белками, к примеру, CD44. CD44 является важным маркером различных раковых стволовых клеток (РСК) (Toshiyuki, 2012). Однако почему CD44 является маркером РСК, остается в значительной степени неизвестным. Недавно было сообщено, что CD44, ассоциированный с липидными рафтами, необходим для выживания находящихся в суспензионном состоянии РСК посредством CD44-SFK-интегриновой передачи сигнала (SFK - Src-семейство киназ), что приводит к опухолевому метастазированию (Su et al., 2011).

В составе липидных рафтов есть маркерные молекулы, часто используемые в биохимических и цитохимических исследованиях. Ганглиозид GM1, является наиболее часто используемым маркером среди предполагаемых липидных компонентов рафтов; он был обнаружен с помощью GM1-связывающей молекулы- В субъединицы холерного токсина (Harder et al., 1998). Белковые маркеры, такие как кавеолы и флотиллины, также часто используются для обнаружения липидных рафтов (Toshiyuki, 2012).

1.2.1 Основные компоненты и функции липидных рафтов

Сфинголипиды получают из церамида, липида, участвующего в многочисленных клеточных процессах, включая дифференцировку, адгезию, миграцию и апоптоз. Из церамида в эндоплазматическом ретикулуме синтезируются сфинголипиды или церамиды переносятся в комплекс Гольджи для синтеза ганглиозидов (в частности, GM1 и GM3). Сфинголипиды могут способствовать трансмембранным событиям в отсутствие трансмембранных белков (Head et al., 2013).

Холестерин - еще один важный мембранный компонент липидных рафтов. После его синтеза в эндоплазматическом ретикулуме, холестерин транспортируется к аппарату Гольджи, где он связывает сфинголипиды или белки, такие как кавеолин (Head et al., 2013). Эти обогащенные сфинголипидом и холестерином структуры самоагрегируются в аппарате Гольджи и образуют везикулы, которые транспортируются к плазматической мембране с образованием липидного рафта. При образовании рафтов сфинголипиды ассоциируются через полярные головки, а холестерин встраивается между гидрофобными хвостами соседних молекул сфинголипидов (Rietveld et al., 1998; Zocher et al., 2012). Холестерин связывает определенные мембранные белки, такие как рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs), и может влиять на свойства GPCRs и, предположительно, других мембранных белков (Head et al., 2013). Также наличие холестерина в плазматической мембране важно для организации специфических доменов и регуляции процессов сигнализации. Холестерин участвует в перераспределении доменов липидных рафтов во время передачи сигнала в мигрирующих клетках и в регуляции роста нервов (Ramprasad et al., 2007).

В структуру липидных рафтов входит семейство Src-киназ, регулирующих работу киназ фокальных адгезий (FAK). FAK влияет на подвижность клеток, регулируя активность малых ГТФаз Rho, фактора обмена гуанинового нуклеотида (GEF) и внеклеточной сигнальной киназы (Erk1 / 2) митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) (Schlaepfer, Mitra, 2004; Mitra et al., 2005). Хотя известно, что FAK-белки, в отличие от Src-семейства киназ не расположены липидных рафтах, FAK-белки могут взаимодействовать с рафтами несколькими способами. Связывание с интегринами, компонентами внеклеточного матрикса, приводит к активации FAK-белков, и эта активация может быть дополнительно усилена костимуляцией факторами роста, такими как, основной фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста или тромбоцитарный фактор роста (Jeon et al., 2010). При активации, FAK-белок аутофосфорилируется и связывает Src-киназу, которая, в свою очередь, фосфорилирует

другие сайты FAK и FAK-связывающих белков. Фосфорилированный FAK является регулятором разных сигнальных процессов, которые регулируют рост, выживание и морфогенез клеток (Schlaepfer et al., 2004)

Стоит отметить, что липидные рафты облегчают сборку белков клеточной мембраны и формируют сигнальные платформы. Эти платформы взаимодействуют с цитоскелетом (через малые ГТФазы), чтобы облегчить транспортировку липидов и белков из внутриклеточных везикул в плазматическую мембрану, в частности, в липидные рафты. «Кластеризация» белков помогает создавать поляризованные платформы, необходимые для адгезии к внеклеточному матриксу, клеточной миграции, а в случае гладкой и поперечнополосатой мышц, механотрансдукции (Head et al., 2013).

1.2.2 Модели липидных рафтов

Структура липидного рафта рассматривается как асимметричный билипидный слой со сфинголипидами, расположенными в наружном монослое мембраны, и глицерофосфолипидами, такими как фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, расположенными во внутреннем монослое, и холестерином, сосредоточенном в обоих липидных слоях. Специфичные трансмембранные белки интегрированы в липидный рафт вместе с белками, прикрепленными ГФИ-якорями, расположенными на внешней стороне мембраны, и эффекторными липопротеинами на противоположной стороне. Считают, что обе стороны мембраны связаны между собой переплетением длинных N-ацильных цепей сфинголипидов с холестерином (Quinn, 2010).

Латеральная диффузия липидов в многокомпонентных двухслойных мембранах осуществляется посредством сложного согласованного динамически-коррелированного движения с окружающими липидами в виде малых кластеров (Arajalahti et al., 2010). Движущей силой для создания больших кластеров или доменов в соответствии с моделью липидного рафта является взаимодействие между холестерином и сфинголипидами. Кластеризация ГФИ-заякоренных белков в рафте происходит за счет межмолекулярной водородной связи, а пустоты, создаваемые крупными головными группами, в значительной степени заняты холестерином (Quinn, 2010).

Можно выделить четыре области липидных рафтов. К ним относятся:

1. Упорядоченные структуры, в которых мембранные белки являются главными молекулами;
2. Жидко-неупорядоченные домены, в которых олигомерные белковые структуры упаковываются липидами в жидкую двухслойную матрицу;

3. Жидко-упорядоченные домены, образованные взаимодействием стеролов с полярными липидами мембраны. В мембранах млекопитающих домен состоит из стехиометрического комплекса, образованного между одинаковыми видами сфинголипидов и холестерина в молярных соотношениях 1.7: 1. Мембранные белки в значительной степени исключены из этих доменов;
4. Квазикристаллические домены, которые образуются между асимметричными сфинголипидами и фосфолипидами. Такие структуры обладают свойствами жидко-упорядоченной фазы. Полярная группа асимметричных сфинголипидов обеспечивает основу для специфических взаимодействий с белками липидных рафтов (Quinn, 2010).

На рисунке 2 демонстрируется модель липидного рафта.

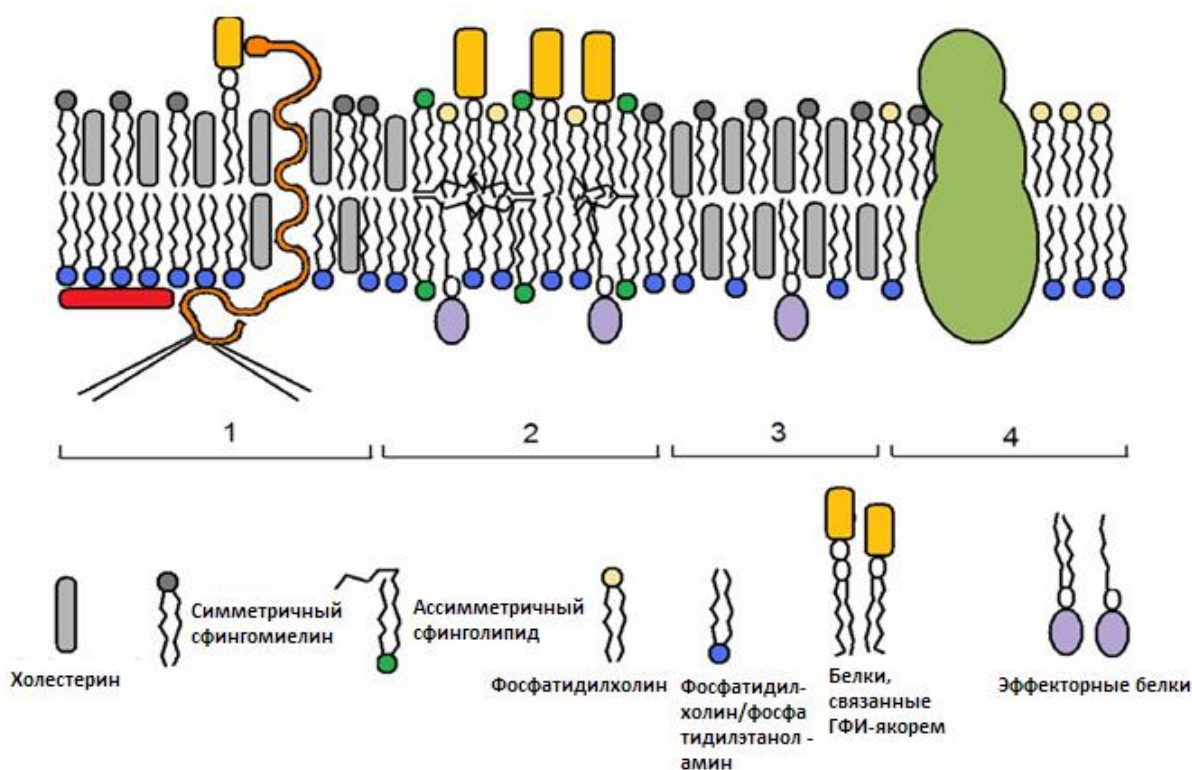


Рисунок 2. Модель липидного рафта: рисунок иллюстрирует четыре мембранных домена. 1- Область рафтов, состоящая из комплексов сфингомиелина и холестерина в пропорциях 1.7: 1, в которую встраиваются белки, связанные с ГФИ-якорем. Специальные адаптерные белки могут быть компонентами данного домена липидных рафтов либо в виде трансмембранных белков, специально адаптированных для взаимодействия со сфингомиелин-холестериновым комплексом, либо с внешними белками, ассоциирующимися с полярными группами липидов на цитоплазматической стороне плазматической мембраны. Цитоплазматические домены таких белков могут быть связаны с элементами цитоскелета. 2- Сигнальные платформы, сформированные из квазикристаллической структуры, состоящей из комплекса асимметричных сфинголипидов (галактозилсфинголипида или сфингомиелина)

и фосфатидилхолина 1: 1, в которые встроены белки, связанные с ГФИ-якорем. Также с цитоплазматической стороны мембраны встроены эффекторные белки, участвующие в сигнальной трансдукции. **3-** Этот домен липидного рафта представляет собой жидко-упорядоченную структуру, состоящую из сфингомиелина, холестерина во внешнем липидном монослое и кислого фосфолипида, холестерина в цитоплазматическом липидном монослое. Домен **3** исключает мембранные белки и липидные компоненты, присутствующие в домене **4**. Переработано по (Quinn, 2010).

Есть предположение, что в клеточных мембранах могут быть два типа липидных рафтов. Один тип, обогащенный холестерином и сфингомиелином, содержит кавеолы, CD44 и рецепторные тирозинкиназы, и не только отвечает за клеточный гомеостаз, но также участвует в трансформации клеток, развитии опухоли, в ангиогенезе и метастазировании. Второй тип липидных рафтов обогащен церамидами и сфингомиелином, содержит CD95 (Fas-рецептор апоптоза) и участвует в регуляции клеточной гибели (Patra, 2008).

1.2.3 Значимость липидных рафтов

Липидные рафты играют важную роль при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера. Предполагается, что измененный гомеостаз липидных рафтов или «старение липидного рафта» является фактором превращения белка-предшественника амилоида в бета-амилоиды (Head et al., 2013).

Изменения в целостности липидных рафтов из-за окислительного стресса, которые приводят к изменению физиологических свойств рафтов или истощению содержания мембранного холестерина, не только изменяют клеточную полярность, передачу сигнала и морфологию клеток, но также могут способствовать возникновению патологии органов, в том числе органов нервной системы (Head et al., 2013).

Также липидные рафты могут быть вовлечены в сигнальные пути развития рака (Patra, 2008). Например, липидные рафты являются необходимыми структурами для перераспределения мембранных рецепторов при миграции клеток аденокарциномы молочной железы (линия MCF-7). А разрушение рафтов с помощью агентов, экстрагирующих холестерин, блокирует образование ламеллиподий и ингибирует хемотаксическую миграцию клеток MCF-7 (Toshiyuki, 2012).

1.2.4 Разрушение липидных рафтов с помощью метил-бета-циклодекстрина (МБЦД)

Вследствие экстракции мембранного холестерина из клеток, обработанных МБЦД, происходит разрушение липидных рафтов, что приводит к реорганизации актинового цито-скелета и изменениям в регуляции разборки фокальных контактов (Wang et al., 2013). Однако извлечение холестерина из рафтов может приводить как к сборке, так и разборке актинового цитоскелета. А направление перестроек активного цитоскелета, вероятно, определяется исходным соотношением глобулярного и фибриллярного актина в клетке. В клетках с высоким содержанием фибриллярного актина (например, линия BALB/3T3) после разрушения липидных рафтов наблюдается деполимеризация актинового цитоскелета и разборка фокальных контактов. В тех клетках, которые характеризуются слабым развитием сети актиновых филаментов и наличием большого количества глобулярного актина (например, линии 3T3B-SV40, K562), напротив, происходит полимеризация актинового цитоскелета, увеличение числа стресс-фибрилл и фокальных контактов (Чубинский-Надеждин, 2012).

До сих пор остается открытым вопрос о сигнальных механизмах, которые опосредуют реорганизацию актинового цитоскелета после нарушения целостности липидных рафтов. Показано, что процессы сборки или разборки актинового цитоскелета могут контролироваться фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом (PIP₂) и фосфатидилинозитол-4-монофосфатом (PIP) за счёт диссоциации кэпирующего белка от актиновых филаментов (Schafer et al., 1996). По другим данным литературы, воздействие МБЦД на клетки меланомы человека (линия A375) приводит к реорганизации актинового цитоскелета посредством сигнального пути Src-RhoA-ROCK. Разрушение липидных рафтов вызывает дислокацию киназ семейства Src из липидных рафтов и инактивацию, что приводит к высокой активации RhoA, ROCK (Rho-зависимая киназа) и формированию многочисленных стресс-фибрилл. После формирования стресс-фибрилл ингибируются дефосфорилирование белков фокальных контактов и интернализация β 3-интегрина, что приводит к подавлению разборки фокальных адгезий. Эти данные показывают механизм, с помощью которого липидные рафты регулируют разборку фокальных адгезий при миграции опухолевых клеток и подчеркивают потенциал агентов, воздействующих на липидные рафты, в качестве эффективных противораковых лекарственных средств (Wang et al., 2013). На рисунке 3 изображена клетка до и после разрушения липидных рафтов.

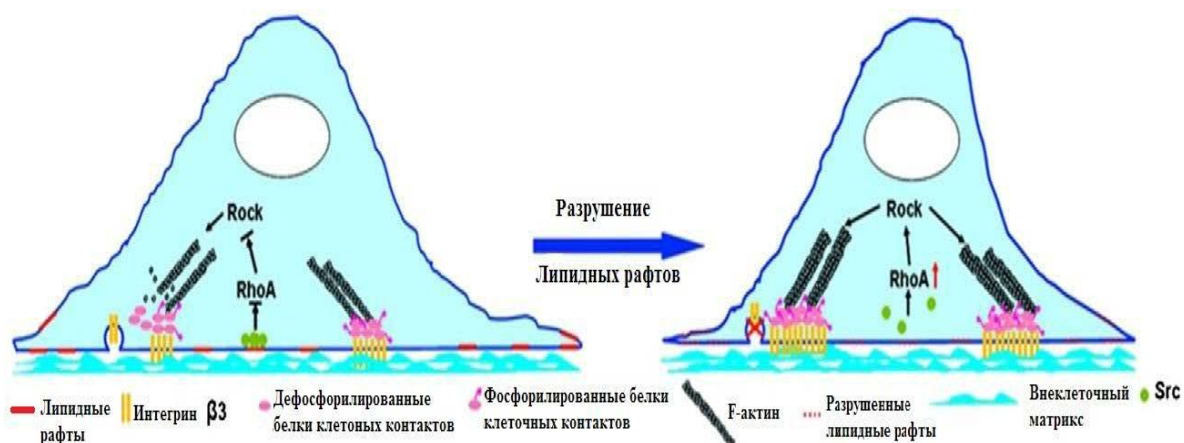


Рисунок 3. Модель роли липидных рафтов в регуляции разборки фокальных контактов.

Неповрежденные липидные рафты модулируют разборку фокальных контактов, контролируя динамику интернализации интегрин, опосредованной актиновым цитоскелетом, и дефосфорилирование белка фокальных адгезий. Функция липидных рафтов в этом процессе осуществляется посредством сигнального пути Src-RhoA-ROCK. Переработано по (Wang et al., 2013).

1.3 Что такое метил-бета-циклодекстрин?

Многочисленные исследования показали, что различные функции клеток меняются, когда клетки подвергаются воздействию метил-бета-циклодекстринов (МБЦД), фармакологических агентов, обычно используемых для удаления мембранного холестерина (Zidovetzki, Levitan, 2007).

МБЦД представляет собой циклический олигосахарид, состоящий из 7 α -(1-4)-связанных звеньев D-глюкопиранозы, которые являются продуктами первичной деградации крахмала (Davis, Brewster, 2004; Uekama, 2004). Это соединение давно признано в качестве мощного носителя гидрофобных лекарственных средств, поскольку оно, хотя и растворимо в воде, содержит гидрофобную полость, которая может инкапсулировать различные гидрофобные молекулы. На рисунке 4 представлена схема строения молекулы МБЦД.

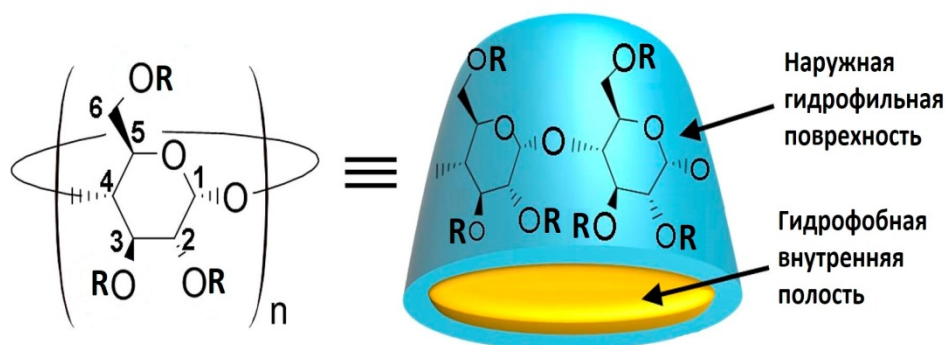


Рисунок 4. Структура МБЦД. Это соединение состоит из связанных α -(1-4)-гликозидными связями звеньев D-глюкопиранозы, где число звеньев (n) равно 7, а (R)- метильные группы ($-\text{CH}_3$). Переработано по (Leclercq, 2016).

МБЦД имеет жесткую коническую молекулярную структуру с гидрофобной внутренней поверхностью и гидрофильной наружной. Внутренняя полость МБЦД может встраивать широкий спектр инородных молекул, начиная от полярных соединений, таких как спирты, кислоты, амины и небольшие неорганические анионы, до неполярных соединений, таких как алифатические и ароматические углеводороды, в то время как гидрофильная наружная поверхность помогает МБЦД взаимодействовать с водой (Lopez et al., 2011). МБЦД, из-за простоты строения, небольших размеров и незначительной цитотоксичности, считается подходящим «нанодоставщиком» (Valle, 2004; Vyas et al., 2008). Он может быть объединен в более крупные сборки, такие как полимерные сети или наночастицы, и использоваться для контролируемой доставки

лекарственных средств, химического зондирования (Ogoshi, Harada, 2008; Messner et al., 2010).

МБЦД существует в виде гептамера (Zidovetzki, Levitan, 2007). Степень полимеризации определяет размер гидрофобной полости и, следовательно, сродство циклодекстрина к конкретным классам соединений (Davis, Brewster, 2004; Uekama, 2004). Бета-циклодекстрины, к которым относится и МБЦД, имеют самое высокое сродство к холестерину и являются наиболее эффективными средствами в его экстракции из клеточной мембраны и модельных мембран (Ohtani et al., 1989; Ohvo, Slotte, 1996).

1.3.1 МБЦД используется для удаления холестерина из клеточных мембран

Степень истощения мембранного холестерина зависит от концентрации МБЦД, времени инкубации, температуры и типа клеток. Показано, что МБЦД является наиболее эффективным в качестве акцептора клеточного холестерина по сравнению с другими типами циклодекстринов (Zidovetzki, Levitan, 2007). Когда клетки подвергаются воздействию высокой концентрации МБЦД (5-10 мМ) в течение длительного периода времени (более 2 часов), можно удалить 80-90% общего клеточного холестерина (Kilsdonk et al., 1995; Levitan et al., 2000). В этих условиях клетки обычно теряют свою морфологию, округляются и в крайних случаях становятся нежизнеспособными (Zidovetzki, Levitan, 2007). Уменьшение концентрации МБЦД и/или использование более короткого времени инкубации приводит к истощению мембранного холестерина в меньшей степени.

1.3.2 Влияние МБЦД на распределение холестерина между различными клеточными мембранами

Показано, что плазматические мембраны имеют значительно более высокое содержание холестерина, чем внутриклеточные мембраны. В частности, было установлено, что ~ 90% свободного холестерина находятся в плазматической мембране в нескольких типах клеток (Zidovetzki, Levitan, 2007). Воздействие циклодекстринов на клетки может влиять на концентрацию холестерина во внутриклеточных мембранах (Hao et al., 2002). Было показано, что уровень холестерина во внутриклеточных мембранах регулируется уровнем холестерина в плазматической мембране (Zidovetzki, Levitan, 2007). Таким образом, воздействие циклодекстринов на клетки может изменить распределение холестерина между различными клеточными компартментами с соответствующими физиологическими эффектами.

1.3.3 Извлечение холестерина из липидных рафтов

Данные, полученные на клеточных или модельных мембранах, позволяют предположить, что холестерин в мембране распределен гетерогенно и сконцентрирован в липидных рафтах (Zidovetzki, Levitan, 2007). Было обнаружено, что большая часть поверхности живых клеток занята непрерывной жидко-упорядоченной фазой (т.е. липидными рафтами) (Swamy et al., 2006). Модель, где основная часть клеточной мембраны занята рафтами, также согласуется с экспериментами в модельных системах (Almedia et al., 2005).

Многочисленные исследования показали, что истощение холестерина приводит к диссоциации различных белков из липидных рафтов. Кроме того, истощение холестерина вызывает значительные изменения в физических свойствах рафтов. Истощение холестерина также приводит к исчезновению кавеол (Ushio-Fukai et al., 2001; Dreja et al., 2002) и подавлению мембранного раффлинга (Zidovetzki, Levitan, 2007).

Было показано, что относительно высокие (≥ 10 мМ) концентрации МБЦД и относительно длительные (≥ 30 мин) воздействия приводят к истощению холестерина из всех мембранных фракций. Однако холестерин из липидных рафтов под действием циклодекстринов удаляется более эффективно, чем из участков мембраны, которые не содержат рафтов (Gaus et al., 2004; Rouquette-Jazdanian et al., 2006). Кратковременные (2-10 мин) воздействия и/или низкие (< 1 мМ) концентрации МБЦД могут удалять холестерин предпочтительно из липидных рафтов (Zidovetzki, Levitan, 2007). На рисунке 5 представлена схема воздействия МБЦД на липидные рафты.

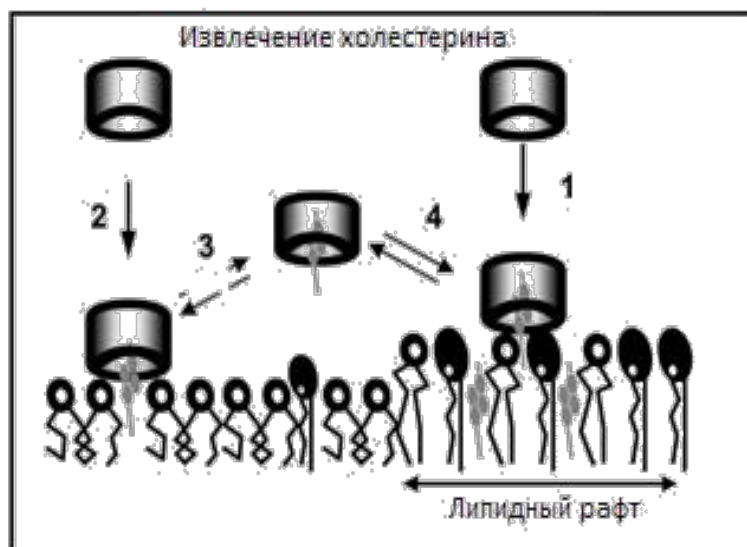


Рисунок 5. Упрощенная схема воздействия МБЦД на липидные рафты. Схема иллюстрирует процесс извлечения холестерина из липидных рафтов (**1, 4**), а также из участков клеточной мембраны, не содержащих рафтов (**2, 3**). Цилиндры представляют собой МБЦД, черные овалы – полярные головки сфингомиелинов, черные круги – полярные головки прочих фосфолипидов. МБЦД приближается к мембране и захватывает холестерин как из липидных рафтов (**1**), так и из участков мембраны, не содержащих рафтов (**2**). Вероятно, удаление холестерина из фракции липидных рафтов более эффективно, чем из других участков мембраны. Кратковременные (2-10 мин) воздействия и/или низкие (≤ 1 mM) концентрации МБЦД могут предпочтительно извлекать холестерин из рафтов. Более продолжительные воздействия и более высокие концентрации МБЦД приводят к истощению холестерина из всех мембранных фракций, а также могут приводить к перераспределению холестерина между рафтами и мембранными фракциями, не содержащих липидных рафтов (**3,4**). Переработано по (Zidovetzki, Levitan, 2007).

2. Материалы и методы

2.1 Клеточные культуры

Для проведения экспериментов использовали клетки линии 3T3B-SV40-эмбриональные фибробласты мыши BALB/c, трансформированные вирусом SV40. Данная клеточная линия была впервые получена путем дезагрегации 14-17-дневных эмбрионов, выделенных из мыши BALB/c (Aaronson, Todaro, 1968). Клетки были получены из “Коллекции культур клеток позвоночных” ИНИЦ РАН.

Культивирование проводили в чашках Петри в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium; Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Fetal bovine serum, FBS; HyClone, США) и антибиотиков. За 1-2 дня до эксперимента проводили пересев клеток в стерильный четырехлуночный планшет (Nunc, США), с сохранением прежних условий культивирования.

2.2. Измерение подвижности клеток методом застания экспериментальной раны

Метод застания экспериментальной раны (wound healing assay)- это дешёвый, простой в освоении и распространённый способ, подходящий для изучения клеточной миграции *in vitro*. Этот метод, в частности, удобен для изучения влияния межклеточных взаимодействий и взаимодействий типа клетка-матрикс на миграцию клеток (Liang et al., 2007). Для этого метода клетки линии 3T3B-SV40 пересекали в стерильный 4-х луночный планшет за 2 дня до эксперимента, чтобы клеточная культура достигла состояния 95-100% конфлюэнтного монослоя к моменту начала проведения экспериментальной работы. Клетки культивировали при 37°C в 1 мл среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотика гентамицина в концентрации 80 мкг/мл. В день опыта клетки обрабатывали 5 мМ Метил-бета-циклодекстрина (Sigma-Aldrich, США) в течение часа в бессывороточной среде DMEM. Контрольными являлись клетки, выдержанные также в течение часа в бессывороточной среде без добавления МБЦД. В опытах наносили экспериментальную рану, или царапину (scratch) размером от 400 до 600 мкм на клеточный монослой пластиковым носиком объёмом на 200 мкл. Кондиционную среду сливали, один раз промывали клетки однократным натрий-фосфатным буфером (PBS) для отмывки лунок планшета от погибших клеток. Далее к клеткам добавляли полную среду или среду без сыворотки. На инвертированном микроскопе Carl Zeiss AxioObserver Z1 находили нужные участки зоны повреждения и фотографировали их с интервалом 1 кадр в 30 минут в течение 42 часов.

2.3. Определение скорости клеточного движения методом измерения миграции одиночных клеток

Метод измерения миграции одиночных клеток проводится для изучения разных параметров движения (скорости передвижения за определенное время/ весь период миграции, суммарного пройденного расстояния и т.п.) как одиночных клеток, так и клеточной популяции. Также он применяется для реконструкции траекторий движения клеток на основе координат x,y, которые регистрируются во времени (Masuzzo et al., 2016).

Для проведения эксперимента по миграции одиночных клеток клетки пересевали в 4-х луночный планшет не за два дня, как при проведении эксперимента по зарастанию раны, а за один день до проведения опыта. Это нужно для того, чтобы клеточная культура не достигла состояния конфлюэнтного монослоя к моменту начала проведения эксперимента, и между клетками было свободное пространство, что является важным моментом при изучении миграции одиночных клеток, не входящих в состав клеточного пласта. В день опыта клетки обрабатывали 5 мМ МБЦД в течение часа в среде DMEM без добавления сыворотки. Контрольными являлись клетки, которые были выдержанны в бессывороточной среде без добавления МБЦД. Сливали кондиционную среду, один раз промывали клетки однократным PBS для отмывки лунок планшета от погибших клеток. Далее к клеткам добавляли полную среду или среду без сыворотки. С помощью инвертированного микроскопа Carl Zeiss AxioObserver Z1 находили участки с клетками, где те находятся на наибольшем расстоянии друг от друга, и проводили фотосъемку с интервалом 1 кадр в 10 минут в течение 20 часов.

2.4. Микроскопия

В опытах по зарастанию экспериментальной раны и миграции одиночных клеток был использован микроскоп Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия) с объективом A-Plan 10x/0,25 – инвертированный моторизованный микроскоп с дифференциально-интерференционным методом контрастирования, снабженный инкубационной камерой для поддержания газовой смеси и температуры. Фотосъемку производили при помощи ПЗС-камеры AxioCamHR3. На рисунке 6 изображена автоматизированная установка на базе инвертированного микроскопа Axio Observer Z1.

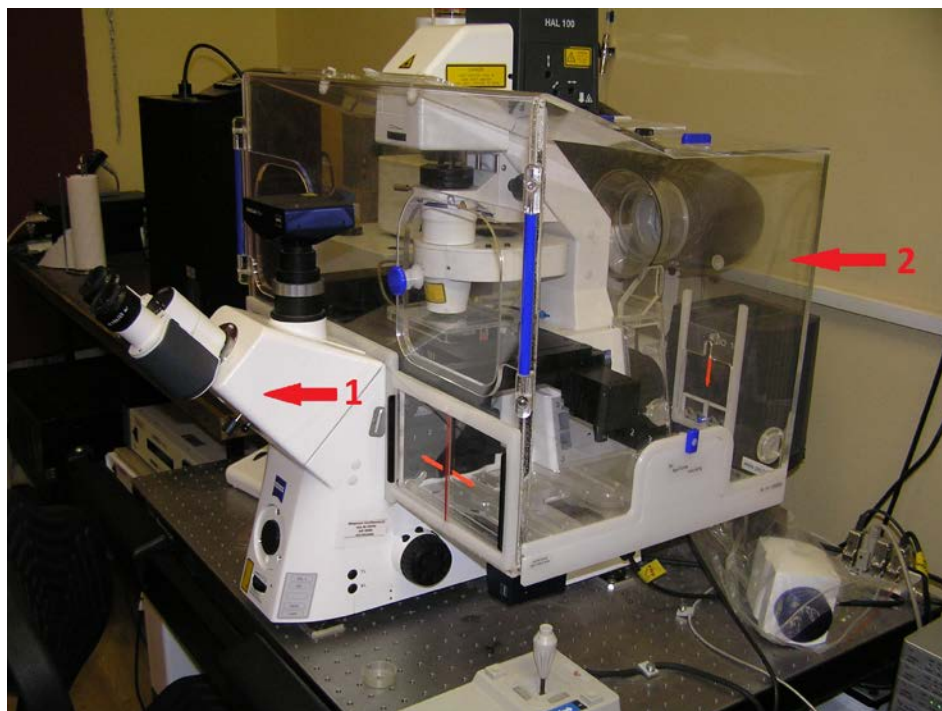


Рисунок 6. Изображение инвертированного моторизованного микроскопа Axio Observer Z1 (1), снабженного инкубационной камерой (2). Изображение любезно предоставлено зав. лаб. Ионных механизмов клеточной сигнализации Института цитологии РАН, д.б.н. Ю.А. Негулевым.

2.5. Обработка изображений

В экспериментах по зарастанию раны полученные на микроскопе изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения TScratch (www.cse-lab.ethz.ch). TScratch - программный инструмент для автоматического анализа зарастания экспериментальной раны с возможностью корректировки получаемых данных в полуавтоматическом методе (Gebäck et al., 2009). Были использованы полуавтоматический метод в эксперименте по измерению подвижности клеток и автоматический метод в эксперименте по сравнению программных обеспечений, подходящих для измерения площади зарастания раны. Оба метода базируются на программном алгоритме «Порог» («Threshold»), с помощью которого устанавливаются верхние и нижние значения порога яркости пикселей для области интереса (например, области экспериментальной раны) и заднего фона изображения (например, области с клетками). Однако в полуавтоматическом методе возможна дополнительная корректировка значения «Порога» уже после анализа площади раны с целью наиболее точного определения значений площади. При работе в TScratch проводили следующие этапы:

1. Загрузка серии изображений (Browse), полученных в ходе фотосъемки экспериментальной раны;
2. Запуск анализа площади раны (Run analysis)

3. Корректировка значения «Порога» (в эксперимента по измерению клеточной подвижности);
4. Сохранение полученных данных (Done).

Анализировали изображения, полученные от точки начала проведения экспериментов до момента застания раны / до десятого кадра (в эксперименте по сравнению программных обеспечений). На основе полученных данных составляли таблицы зависимостей изменений площадей от времени / кадра в программном обеспечении Microsoft Excel (Microsoft, США). В эксперименте по измерению клеточной подвижности клеток площадь раны нормировали, приравнивая значение начальной площади раны к 1, а все последующие представляли, как их отношение к начальной площади.

В экспериментах по миграции одиночных клеток изображения обрабатывали с помощью компьютерной программы CellTracker (<http://celltracker.website/>). Посредством CellTracker, используя ручной метод, отмечали положение клеток в пространстве на каждом кадре и, таким образом, находили регистрируемые во времени x,y координаты выборочных клеток. На основе полученных данных программа автоматически находила скорость миграции каждой клетки из выборки. Далее в Microsoft Excel составлялась таблица зависимости скорости клеточной миграции от времени.

В эксперименте по сравнению программных обеспечений, которые подходят для измерения площади застания раны, помимо TScratch применяли программное обеспечение FIJI (<http://fiji.sc/>) в ручном режиме. Вручную (функция «Area») обводили область экспериментальной раны, начиная с точки начала эксперимента (первый кадр) до 10 кадра. Также использовали плагин FIJI - «Wound healing tool», который, как и TScratch, имеет автоматический режим анализа площади раны. Полученные таблицы зависимостей изменений площадей раны от номера кадра обрабатывали в программном обеспечении Microsoft Excel. Площади раны представляли как отношение к общей площади кадра.

2.6. Статистическая обработка данных

Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Различия с $p \leq 0,05$ считали достоверными.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Проверка автоматического метода работы программного обеспечения

TScratch для измерения площади зарастания экспериментальной раны

Для проверки автоматического метода был проведен опыт на клетках линии 3T3B-SV40 по зарастанию экспериментальной раны. Полученные данные обработали в программе TScratch. Для сравнения точности измерения площади раны экспериментальные данные анализировали ручным методом (в программе Fiji). Значения, полученные ручным методом, принимали за контрольные. Также сравнение проводили с плагином программы Fiji - «Wound healing tool», имеющий автоматический режим работы, как и TScratch. Результаты данного исследования представлены на рисунке 7.

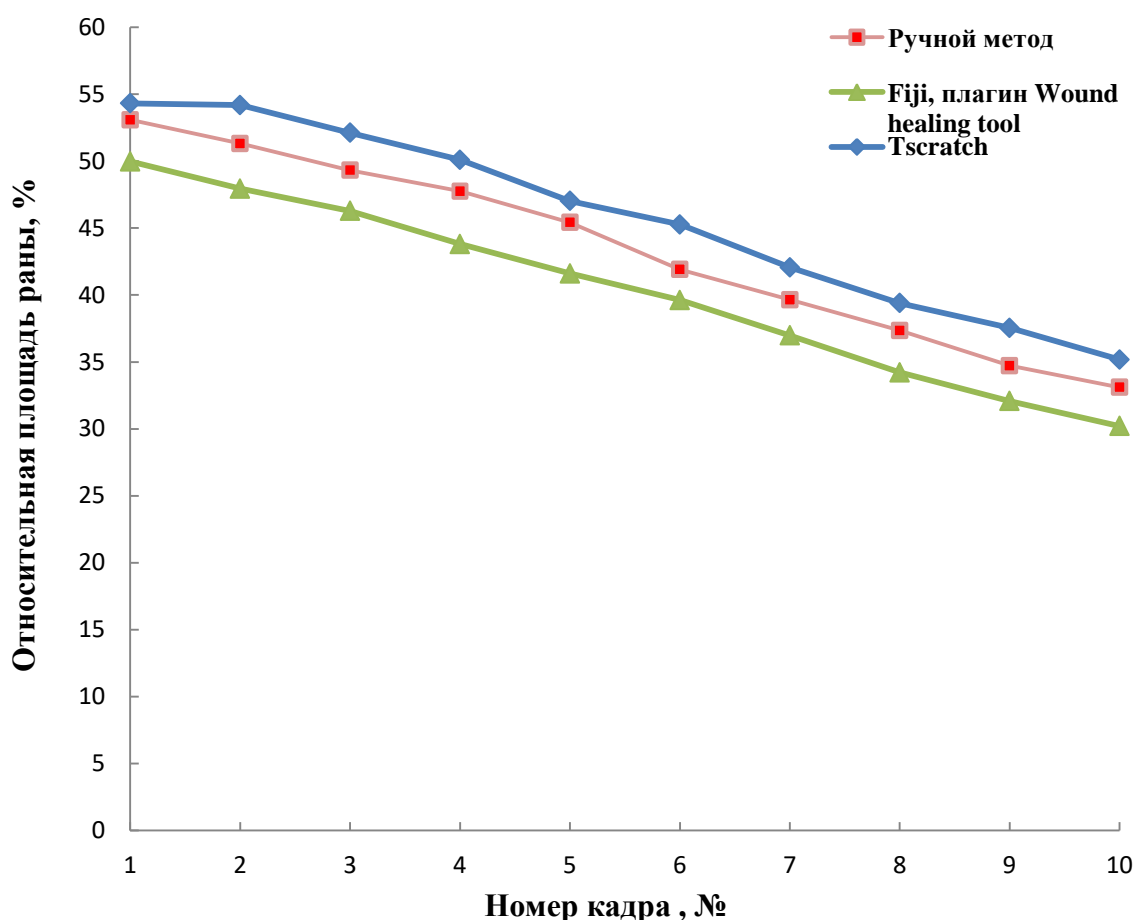


Рисунок 7. Сравнение методов измерения площади зарастания экспериментальной раны. На графике отображены кривые, значения площади раны с первого кадра по десятый. Площади раны представили как отношение к общей площади кадра.

Результаты эксперимента (рис. 7) демонстрируют, что автоматический метод программы TScratch завышает значения площади раны по сравнению с ручным методом (контролем). Средняя ошибка измерения по отношению к контролю не превышает 6 %. Плагин «Wound healing tool», наоборот, занижает значения площади раны, а средняя

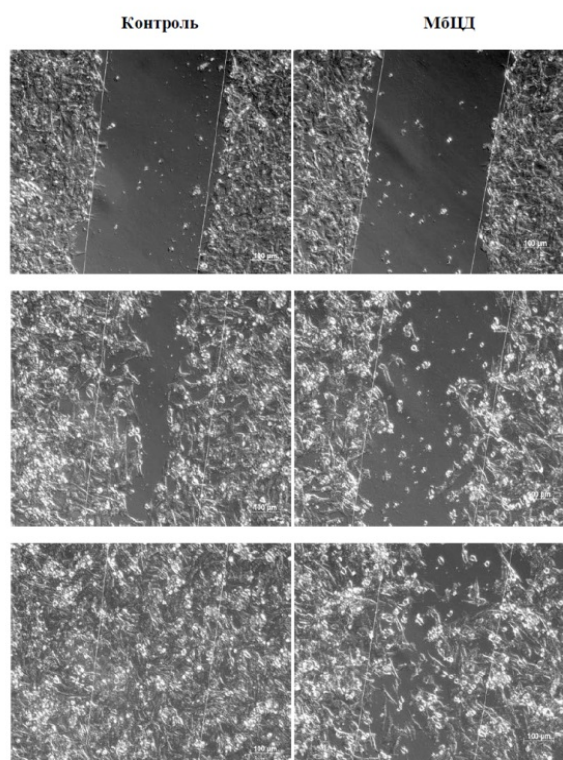
ошибка измерения не превышает 7%. Погрешность автоматического метода программы TScratch относительно невелика, благодаря чему данный метод является альтернативой ручному методу. Однако для уменьшения погрешности при анализе площади раны было принято решение использовать в эксперименте по измерению подвижности клеток полуавтоматический метод программы TScratch, совмещающий быстроту анализа экспериментальных данных автоматического метода и точность определения площади раны ручного метода (Gebäck et al., 2009). Плагину «Wound healing tool» не было отдано предпочтение из-за отсутствия полуавтоматического метода измерения площади раны, который позволяет корректировать ошибки определения площади раны, возникающие в автоматическом режиме.

3.2 Измерение подвижности клеток методом застания экспериментальной раны

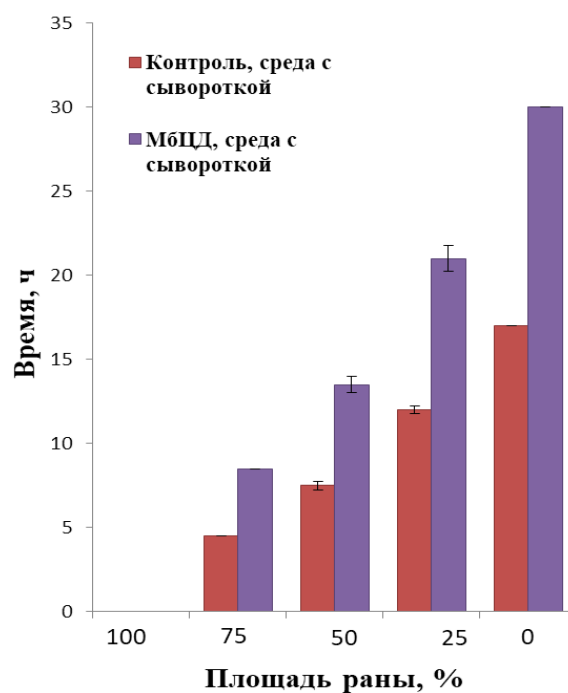
Основной задачей данного эксперимента являлось измерение подвижности клеток линии 3T3B-SV40. Для этого был выбран метод застания экспериментальной раны. Клетки инкубировали в течение часа с МБЦД в концентрации 5 мМ и оценивали изменение скорости застания раны в сравнении с контролем. Снижение скорости миграции было отмечено рядом исследователей на разных типах клеток, например, на линиях NSCLC (клетки немелкоклеточного рак легкого) и A375 (клетки кожной меланомы человека) (Jeon et al., 2010; Wang et al., 2013). Но клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши, трансформированная вирусом SV40, не была охарактеризована с этой стороны.

Результаты данного исследования представлены на рисунке 8 и демонстрируют, что МБЦД вызывает замедленное застание экспериментальной раны клеточного монослоя за счёт понижения подвижности клеток по сравнению с контролем.

А



Б



В

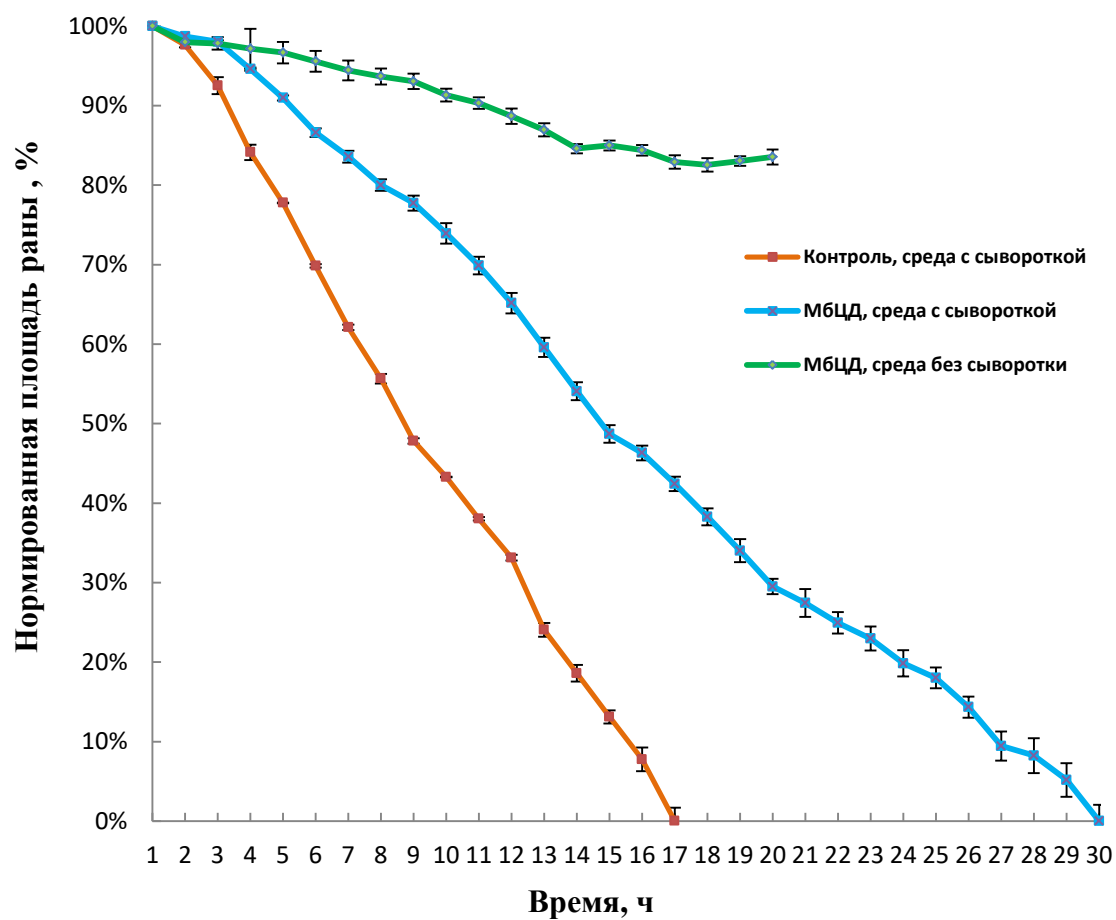


Рисунок 8. Влияние М6ЦД на скорость закрывания экспериментальной раны в клетках линии 3Т3В-SV40. А - изображения демонстрируют скорость закрывания раны в контроле (слева) и при

обработке клеток 5 мМ МБЦД (справа). Показаны изображения для трех временных промежутков - в момент начала эксперимента (0 ч), через 8 и 17 часов, соответственно. Выделенный масштаб составляет 100 мкм. **Б** - график, демонстрирующий время уменьшения площади раны на каждые 25 процентов от первоначальной площади, где 100 % - начальная площадь раны; 0 % - полное зарастание раны клетками. **В** - график зарастания экспериментальной раны. Значения площади раны нормированы на площадь в момент начала эксперимента. N=3, $p \leq 0,05$.

Результаты эксперимента (**рис. 8 А, В**) демонстрируют уменьшение скорости зарастания экспериментальной раны под действием 5 мМ МБЦД. Через 8 часов после начала эксперимента площадь свободной от клеток зоны (раны) относительно изначальных границ составила 48% в контроле, где клетки находились в среде с сывороткой, и 78% при обработке клеток МБЦД. К 17 часам размер раны, где клетки были проинкубированы с МБЦД, составлял 38%, а в контроле – 0% (т.е. рана полностью заросла клетками) (**рис. 8 А, В**). Также на рисунке (**8 Б**) показано, что зарастание экспериментальной раны на каждые 25% от первоначальной площади клетками, которые были обработаны МБЦД, происходило в 1,8 раза медленнее по сравнению с контролем.

Снижение интенсивности клеточной подвижности, вероятно, можно связать с нарушением целостности липидных рафтов вследствие извлечения мембранного холестерина под действием метил-бета-циклодекстрина. Разрушение липидных рафтов приводит к реорганизации актинового цитоскелета: к увеличению числа стресс-фибрилл. Также увеличиваются количество и размер фокальных контактов в клетке, что приводит к уменьшению скорости клеточной миграции. Что касается молекулярных механизмов перестройки актинового цитоскелета из-за разрушения липидных рафтов, то этот вопрос до сих пор остается открытым. По одним данным, деструкция рафтов ведет к дислокации киназ семейства Src из липидных рафтов и их инактивации, что приводит к высокой активации белков RhoA, ROCK и формированию прочных стресс-фибрилл (Wang et al., 2013). По другим данным, возможными участниками сигналинга, который связан с реорганизацией цитоскелета, могут являться фосфоинозитиды (PIP, PIP2), вызывающие диссоциацию кэпирующего белка от F-актина (Чубинский-Надеждин, 2012).

График (**8 В**) демонстрирует, что клетки, которые обрабатывались 5 мМ МБЦД в течение часа, а потом были помещены в среду DMEM без сыворотки, начинают массово погибать через 14 часов после начала эксперимента, что не позволяет экспериментальной ране зарости до монослоя. Клетки, которые также были обработаны МБЦД, но находились в среде с FBS, не погибали, а рана полностью зарастала. Гибель клеток в данном эксперименте связана с отсутствием в среде сыворотки, богатой различными факторами роста, которые необходимы для поддержания роста культивируемых клеток (Kulkarni, McCulloch, 1994). Также стоит отметить, что происходило увеличение скорости миграции

клеток, инкубированных с МБЦД в среде с сывороткой, через 8 часов после начала эксперимента. Это, вероятно, связано с активным потреблением клетками холестерина, находящегося в сыворотке, и дальнейшим восстановлением липидных рафтов (Saha et al., 2017). Таким образом, после обработки клеток метил-бета-циклодекстрином, в случае отсутствия в среде, куда были помещены клетки, сыворотки, наблюдается клеточная гибель. А при наличии в среде сыворотки, возможно повышение скорости клеточной миграции через определенное количество времени вследствие поглощения клетками холестерина из среды с сывороткой.

3.3 Определение скорости клеточного движения методом измерения миграции одиночных клеток

Задачей этого эксперимента было измерение скорости миграции одиночных клеток линии 3T3B-SV40. Эксперимент был проведен для того, чтобы определить, соответствуют ли данные результаты тем, которые были получены путем проведения эксперимента по застанию раны. Клетки были обработаны в течение часа 5 мМ МБЦД. Потом они были помещены в полную сывороточную среду. Оценивалось изменение скорости миграции данных клеток по сравнению с контрольными, также помещёнными в среду с сывороткой. Результаты данного исследования представлены на рисунке 9.

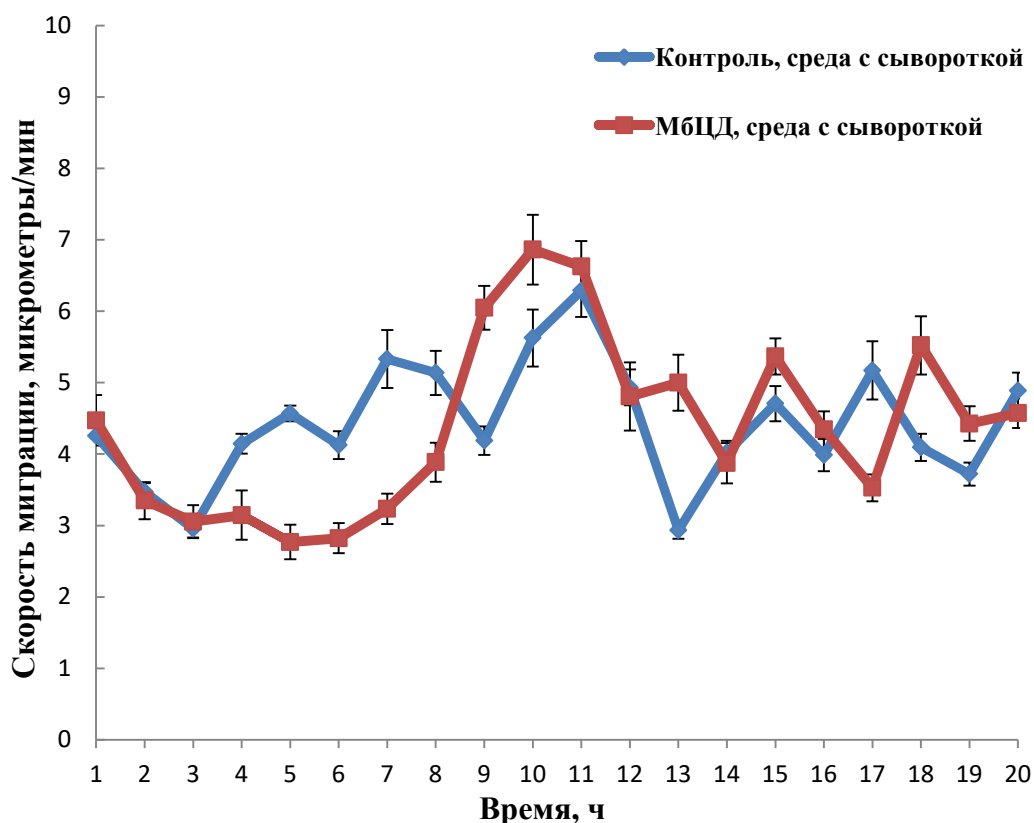


Рисунок 9. Влияние метил-бета-циклодекстрина на скорость миграции клеток линии 3T3B-SV40 в эксперименте по одиночной миграции. На графике отображены изменения скорости миграции контрольных клеток и клеток, обработанных 5 мМ МБЦД. N=7, $p \leq 0,05$.

Результаты данного эксперимента демонстрируют уменьшение скорости миграции одиночных клеток при действии 5 мМ МБЦД по сравнению с контролем. Однако через 8 часов после начала опыта наблюдалось увеличение скорости миграции, вследствие чего изменение скорости клеточного движения стало больше соответствовать контрольному. Повышение скорости миграции, вероятно, связано с поглощением клетками холестерина из сыворотки (Wang et al., 2013) и соответствует данным, полученным из эксперимента по застанию раны.

4.Выводы

1. Была проведена проверка работы автоматического метода программы TScratch. Данный метод позволяет определять площадь застания экспериментальной раны с небольшой погрешность измерения.
2. Частичная экстракция мембранного холестерина при воздействии 5 мМ МБЦД на клетки линии 3T3B-SV40 приводит к уменьшению скорости застания экспериментальной раны.
3. Клетки демонстрируют снижение скорости движения в эксперименте по миграции одиночных клеток вследствие воздействия на них 5 мМ МБЦД.
4. Результаты оценки скорости клеточного движения, полученные на моделях застания экспериментальной раны и при исследовании подвижности одиночных клеток подтверждают, что разрушение липидных рафтов при действии 5 мМ МБЦД снижает скорость клеточной миграции клеток 3T3B-SV40.

5. Список литературы

1. Чубинский-Надеждин В.И. Роль мембранного холестерина в регуляции механочувствительных ионных каналов и актинового цитоскелета. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 2012.
2. Aaronson SA., Todaro GJ. 1968. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J. Cell Physiol.* 72(2):141-148.
3. Almeida P.F.F., Pokorny A., Hinderliter A. 2005. Thermodynamics of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1720:1
4. Ananthakrishnan R., Ehrlicher A. 2007. The Forces Behind Cell Movement. *Int. J. Biol. Sci.* 3(5):303-317.
5. Apajalahti A., Niemela P., Govindan P.N., Miettinen M.S., Salonen E., Marrink S-J., et al. 2010. Concerted diffusion of lipids in raft-like membranes. *Faraday Disc.* 144:411–430
6. Brian P. Head, Hemal H. Patel, Paul A. Insel. 2013. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838(2):532-545
7. Broussard J.A., Webb D.J., Kaverina I. 2008. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 85–90.
8. Davis M.E., Brewster M.E. 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:1023–1035.
9. Dreja K., Voldstedlund M., Vinten J., Tranum-Jensen J., Hellstrand P., Sward K. 2002. Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1267–1272.
10. Gaus K., Kritharides L., Schmitz G., Boettcher A., Drobnik W., Langmann T., Quinn C.M., Death A., Dean R.T., Jessup W. 2004. Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *FASEB J.* 03-0486
11. Gebäck T., Schulz M.M., Koumoutsakos P., Detmar M. 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques.* 46(4):265-274.
12. Hao M., Lin S.X., Karylowski O.J., Wustner D., McGraw T.E., Maxfield F.R. 2002. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J. Biol. Chem.* 277:609–617.
13. Harder T., Scheiffele P., Verkade P., Simons K. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *Journal of Cell Biology.* 141 (4): 929–942.
14. Hynes R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell.* 110:673–687

15. Jeon J.H., Kim S.K., Kim H.J., Chang J., Ahn C.M., Chang Y.S. 2010. Lipid raft modulation inhibits NSCLC cell migration through delocalization of the focal adhesion complex. *Lung Cancer*. 69(2):165-171.
16. Kaverina I., Krylyshkina O., Small J.V. 2002 Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 746–761.
17. Kilsdonk E.P., Yancey P.G., Stoudt G.W., Bangerter F.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem*. 270:17250–17256
18. Kulkarni G. V., McCulloch C. A. G. 1994. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 107: 1169-1179.
19. Leclercq L. 2016. Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications? *Beilstein J. Org. Chem.* 12:2644-2662.
20. Levitan I, Christian A.E., Tulenko T.N., Rothblat G.H. 2000. Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current (VRAC) in bovine endothelial cells. *Journal of General Physiology*. 115:405–416.
21. Liang C.C, Park A.Y., Guan J.L. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2(2):329-333.
22. López C.A., de Vries A.H., Marrink S.J. 2011. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput. Biol.* 7(3):e1002020.
23. Manneville S.E., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629–635.
24. Masuzzo P., Van Troys M., Ampe C., Martens L. 2016. Taking Aim at Moving Targets in Computational Cell Migration. *Trends Cell Biol.* 26(2):88-110.
25. Messner M., Kurkov S.V., Jansook P., Loftsson T. 2010. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 387: 199–208.
26. Mitra S.K., Hanson D.A., Schlaepfer D. 2005 Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 6:56–68.
27. Murai, T. 2011. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. *International Journal of Cell Biology*. 2012:763283
28. Ogoshi T., Harada A. 2008. Chemical sensors based on cyclodextrin derivatives. 8: 4961–4982.
29. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. 1989. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J. Biochem*. 186: 17–22
30. Ohvo H., Slotte J.P. 1996. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 35: 8018–8024.

31. Patra S. K. 2008. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1785 (2): 182–206.
32. Quinn, P. J. 2010. A lipid matrix model of membrane raft structure. *Progress in Lipid Research*. 49(4):390-406.
33. Ramprasad O. G., Srinivas G., Rao K. S., Joshi P., Thiery J. P., Dufour S., Pande G. 2007. Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 64(3): 199–216.
34. Rietveld A., Simons K. 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta*. 1376: 467–479
35. Rouquette-Jazdanian A.K., Pelassy C., Breittmayer J.P., Aussel C. 2006. Revaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signaling. *Cellular Signalling*. 18:105.
36. Saha A.K., Osmulski P., Dallo S.F., Gaczynska M., Huang T.H., Ramasubramanian A.K. 2017. Cholesterol Regulates Monocyte Rolling through CD44 Distribution. *Biophys. J*. 112(7):1481-1488.
37. Schafer D.A., Jennings P.B., Cooper J.A. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol*. 135(1):169-79.
38. Schlaepfer D., Mitra S.K., Ilic D. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1692:77–102.
39. Simons K., Van Meer G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 27(17): 6197–6202.
40. Singer S. J., Nicolson G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175(4023): 720–731.
41. Su Y. J., Lai H. M., Chang Y. W., Chen G. Y., Lee J. L. 2011. Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *The EMBO Journal*. 30(15): 3186–3199.
42. Swamy M.J., Ciani L., Ge M., Smith A.K., Holowka D., Baird B., Freed J.H. 2006. Coexisting Domains in the Plasma Membranes of Live Cells Characterized by Spin-Label ESR Spectroscopy. *Biophys. J*. 90:4452–4465.
43. Uekama K. 2004. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull*. 52:900–915.
44. Ushio-Fukai M.U., Hilenski L., Santanam N., Becker P.L, Ma Y., Griendling K., Alexander R.W. 2001. Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation

- by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:48269–48275.
45. Valle E.D. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*. 39: 1033–1046.
 46. Vyas A., Saraf S., Saraf S. 2008. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem*. 62: 23–42
 47. Wang, R., Bi, J., Ampah, K. K., Ba, X., Liu, W., Zeng, X. 2013. Lipid rafts control human melanoma cell migration by regulating focal adhesion disassembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1833(12): 3195–3205.
 48. Webb D.J., Donais K., Whitmore L.A., Thomas S.M., Turner C.E., Parsons J.T., Horwitz A.F. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol*. 6: 154–161
 49. Webb D.J., Parsons J.T., Horwitz A.F. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turn-over in migrating cells — over and over and over again. *Nat. Cell Biol*. 4: E97–E100.
 50. Wehrle-Haller B. 2012. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol*. 24: 569–581.
 51. Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1768(6):1311-24.
 52. Zocher M., Zhang C., Rasmussen S.G., Kobilka B.K., Muller D.J. 2012. Cholesterol increases kinetic, energetic, and mechanical stability of the human beta2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 109: E3463–E3472.